

博士（農学）佐山充

学位論文題名

テンサイそう根病および根腐病の生物的防除法に関する研究

学位論文内容の要旨

北海道における基幹作物の一つであるテンサイのそう根病は、病原ウイルスの媒介菌である*Polyomyxa betae*の休眠胞子が、土壤中で長期間生存するため、輪作等の耕種的防除法は効果が低く、また、経済的に有効な防除薬剤や十分な抵抗性品種も無いため生物的防除法の開発が求められていた。また、テンサイ根腐病は薬剤の使用にもかかわらず、毎年作付圃場の20%程度に発生がみられているため、予防的に使用できる生物的防除法が求められている。

本研究では、そう根病および根腐病の生物的防除法の開発を目的に、拮抗細菌や菌寄生菌を探査し温室内および圃場における施用法を検討するとともに発病抑制試験を行った。さらに、そう根病に関しては、土壤中の菌数を低減させる要因を探査し、その効果を定量的に評価した。根腐病に関しては、土壤の発病抑止性を解明して防除に利用するために、微生物的特性を調査した。

1. テンサイそう根病の生物的防除法

汚染土壤に栽培した野生エンバクやテンサイが土壤中の*Polyomyxa betae*の休眠胞子数に与える影響について、定量的な調査を行った結果、最確値法で調査した土壤中のウイルス保毒菌数は野生エンバクの9ヶ月間の栽培により減少した。また、抵抗性テンサイ品種ではほとんど変化無く、感受性テンサイ品種では約10倍に増加した。一方、直接法による調査では、抵抗性品種の栽培も感受性品種と同程度に菌数が増加したことから、抵抗性品種は主にウイルスに対する抵抗性に関与しているものと考えられた。また、これらの植物の根浸出液の処理により、休眠胞子の空洞化（細胞質の無い状態）が蒸留水処理に比べて促進されたことから、野生エンバクの栽培による*P. betae*菌数の減少効果の原因の一部は、根浸出液の作用による休眠胞子の空洞化によるものと考えられた。さらに、植物の栽培以外にショ糖やアミノ酸の添加、高pH、高温によっても休眠胞子の空洞化が促進された。

*P. betae*の休眠胞子は同じ科に属する根こぶ病菌と異なり、これまで各種の蛍光色素によって十分には染色されなかった。土壤中の菌数の測定や休眠胞子の観察のための蛍光色素による染色法を検討した結果、SDSによる前処理により十分な染色が可能になることが明らかとなった。さらに、FITC結合レクチンによっても選択的な染色が可能となった。今後、本法は、土壤中の休眠胞子の観察に有効な手段となるものと考えられた。

次に根圈細菌を用いたテンサイそう根病の生物的防除法の開発を目的に、テンサイが長

期間連作されているそう根病発生圃場に栽培したテンサイの細根から428菌株の根圈細菌を分離し、室内試験によって最も効果の高い1菌株（SB-K88）を選抜した。本菌株は、細菌の濃度が高いほど、また接種したP. betae遊走子濃度が低いほど発病抑制効果が強かつた。圃場試験では、育苗時接種により中発生圃場では移植後1.5ヶ月、少発生圃場では3ヶ月間葉の黄化程度を指標とした場合に、発病抑制効果が認められた。同時にSB-K88菌株の定着性を調査した結果、育苗中および移植直後には全細菌数に占めるSB-K88菌株の割合が高かったがその後は減少した。この菌量の低下が栽培後期における効果の低減の一因になっていると考えられた。施用法に関しては、種子コーティング、バーミキュライトなどの担体に付着させたものの土壤混合および培養ろ液の灌注処理を比較したところ、担体の土壤混合で最も効果が高かった。また、抵抗性品種の栽培時におけるSB-K88菌株の利用法として、SB-K88菌株は初期感染を抑制し、抵抗性品種の効果は栽培後期まで継続したことから、両者の組み合わせにより効果が増強できる可能性が示された。

2. テンサイ根腐病の生物的防除

テンサイのRhizoctonia solaniによる根腐病に対する抑止土壤については、その抑止要因がこれまで明らかにされていない。R. solaniの2群2型および4群菌株の菌体の繰り返し接種により、苗立枯病を指標に土壤の抑止性を誘導した。抑止性は、テンサイ栽培の有無に関わらず、菌体接種のみによっても生じ、死菌体によっては生じなかつた。繰り返し接種による土壤中の糸状菌、細菌、放線菌、Trichoderma属菌数の変動はわずかであった。しかし、同時に測定したソイルペレット法による土壤塊からのRhizoctonia菌糸の出現率は減少した。繰り返し接種土壤中におけるR. solaniの菌糸生育は耕地土壤中に比べて劣り、接種5日目で約1/2となり、明らかに、菌糸生育が抑制された。繰り返し接種土壤の抑止性は、培養することにより高まることから、生物的因子であることが示唆された。抑止性は、55℃の通気蒸気処理によってほぼ消失したことから、耐熱性の細菌の関与の可能性は低いものと考えられた。また、抑止性のベノミルに対する感受性は低く、Trichoderma属菌、Gliocladium属菌、Verticillium属菌などは同剤に感受性が高かつた。これらのことから、本実験に用いられた繰り返し接種土壤の主な抑止要因は、ベノミルに非感受性、熱感受性であり、R. solaniに対する抑止土壤の抑止要因としてはこれまでに知られていない微生物である可能性が示唆された。

R. solani AG2-2を繰り返し接種した北海道札幌市および河西郡芽室町の耕地土壤から菌寄生性Verticillium属菌23菌株を分離した。分離菌株の多くはR. solani AG2-2によるテンサイ苗立枯病を抑制したがその程度は菌株により異なつた。分離菌株の中から最も抑制効果の高かつた2菌株（HV8株、HV10株）を選抜した。これら2菌株は施用量が多いほどテンサイ苗立枯病に対する抑制効果が高く、またテンサイ種子へのR. solaniの寄生を強く抑制し、特に5%の濃度で処理した場合にはPCNB(40 ppm)処理と同等の抑制効果を示した。また両菌株はテンサイ根腐病に対しても、株元への1回処理および苗床、植穴、株元への計3回処理で明瞭な抑制効果を示した。光学顕微鏡観察の結果、分離Verticillium属

菌は*R. solani*菌糸の生細胞に寄生し、本菌侵入後に*R. solani*の菌糸が死に至ることが明らかとなった。Verticillium属菌は、形態と生育温度からいざれも*Verticillium biguttatum*と同定された。将来テンサイの生産においても薬剤使用量の削減が求められることが予想されることから、本菌の利用はテンサイ苗立枯病や根腐病の総合防除における有用な技術の一つとなる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査 教授 小林 喜六
副査 教授 内藤 繁男
副査 教授 上田 一郎
副査 助教授 近藤 則夫

学位論文題名

テンサイそう根病および根腐病の生物的防除法に関する研究

本論文は、図35、表21、引用文献129を含み、5章からなる総頁数154の和文論文である。別に参考論文7編が添えられている。

テンサイの重要病害である、そう根病および根腐病の生物的防除法の開発を目的として、拮抗細菌や菌寄生菌を探査し温室内および圃場における施用法を検討し発病抑制試験を行った。さらにそう根病に関しては、土壤中の菌数を低減させる要因を探査し、その効果を定量的に評価した。根腐病に関しては、土壤の発病抑止性を解明して防除に利用するため、微生物的特性を調査した。

1. テンサイそう根病の生物的防除法

汚染土壤に栽培した野生エンバクやテンサイが土壤中の*Polymyxa betaee*の休眠胞子数に与える影響について、最確値法により定量したところ土壤中のウイルス保毒菌数は野生エンバクの9ヶ月間の栽培により減少し、抵抗性テンサイ品種ではほぼ変化無く、感受性テンサイ品種で約10倍に増加した。また、これらの植物の根浸出液の処理により、休眠胞子の空洞化（細胞質の無い状態）が蒸留水処理に比べて促進したことから、野生エンバクの栽培による*P. betaee*菌数の減少効果の原因の一部は、根浸出液の作用による休眠胞子の空洞化によるものと考えられた。糖やアミノ酸の添加、高pH、高温によっても休眠胞子の空洞化が促進された。

これまで各種の蛍光色素によって十分には染色されなかった土壤中の*P. betaee*休眠胞子の染色法を検討したところ、SDSによる前処理により十分な染色が可能になることが明らかとなった。さらに、FITC結合レクチンによっても選択的な染色が可能となった。

根圈細菌を用いたテンサイそう根病の生物的防除法の開発を目的に、テンサイの細根から根圈細菌を分離し、室内試験によって効果の高い1菌株（SB-K88）を選抜した。本菌株は、細菌の濃度が高いほど、また接種した*P. betaee*遊走子濃度が低いほど発病抑制効果が強くあらわれた。圃場試験では、育苗時接種により中発生圃場では移植後1.5ヶ月、少発生

圃場では3ヶ月間葉の黄化程度を指標とした場合に、発病抑制効果が認められた。この時、育苗中および移植直後には全細菌数に占めるSB-K88菌株の割合が高かったが、その後は減少し、菌量の低下が栽培後期における効果の低減の原因の一つになっていると考えられた。施用法に関しては、細菌を付着させたバーミキュライトの土壤混合で最も効果が高かった。また、抵抗性品種の栽培とSB-K88菌株の組み合わせにより、効果が増強できる可能性が示された。

2. テンサイ根腐病の生物的防除

テンサイの*Rhizoctonia solani*による根腐病に対する抑止土壤については、その抑止要因がこれまで明らかにされていない。*R. solani*の2群2型および4群菌株の菌体の繰り返し接種により、苗立枯病を指標に土壤の抑止性を誘導した。抑止性は、テンサイ栽培の有無に関わらず、菌体接種のみによっても生じ、死菌体によっては生じなかった。繰り返し接種による土壤中の糸状菌、細菌、放線菌、*Trichoderma*属菌数の変動はわずかであった。繰り返し接種土壤の抑止性は、培養することにより高まることから、生物的因子であることが示唆された。抑止性は、55℃の通気蒸気処理によってほぼ消失したことから、耐熱性の細菌の関与の可能性は低いものと考えられた。また、抑止性のベノミルに対する感受性は低く、*Trichoderma*属菌、*Gliocladium*属菌、*Verticillium*属菌などは同剤に感受性が高かった。これらのことから、本繰り返し接種土壤の主な抑止要因は、ベノミルに非感受性で熱感受性であり、*R. solani*に対する抑止土壤の抑止要因としてはこれまでに知られていない微生物である可能性が示唆された。

繰り返し接種土壤から菌寄生性*Verticillium*属菌23菌株を分離した。我が国においては、テンサイ苗立枯病および根腐病を抑制する*Verticillium*属菌の報告は無いため、本菌を用いた生物的防除法の開発のための試験を行った。分離菌株の多くは*R. solani* AG2-2によるテンサイ苗立枯病を抑制したがその程度は菌株により異なり、最も抑制効果の高かった2菌株(HV8株, HV10株)は、施用量が多いほど苗立枯病に対する抑制効果が高く、5%の濃度で処理した場合にはPCNB(40 ppm)処理と同等の抑制効果を示した。また両菌株はテンサイ根腐病に対しても、株元処理で明瞭な抑制効果を示した。光学顕微鏡観察の結果、分離*Verticillium*属菌は*R. solani*菌糸の生細胞に寄生し、本菌侵入後に*R. solani*の菌糸が死に至ることが明らかとなった。分離*Verticillium*属菌は、形態と生育温度からいざれも*V. biguttatum*と同定された。本菌の利用はテンサイ苗立枯病や根腐病の総合防除における有用な技術の一つとなる可能性がある。

以上の研究成果は、テンサイ根病と根腐病の生物的防除法開発に重要な手がかりを与えるものであり、学術上応用上高く評価される。よって審査員一同は、佐山充が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。